

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ЗОЛОТЫЕ НАНОЗВЕЗДЫ И НАНОАНТЕННЫ:
ФОТОМОДИФИКАЦИЯ, ЦИТОКСИЧНОСТЬ И ФОТОТЕРМИЧЕСКОЕ
АНТИМИКРОБНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Симоненко Андрея Викторовича

Научный руководитель:

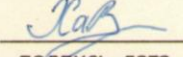
доцент, канд. биол. наук


подпись, дата
25.05.23

М.В. Каневский

Научный консультант:

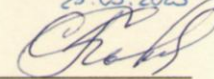
ст. науч. сотр., канд. физ.-мат. наук


подпись, дата
25.05.2023

В.А. Ханадеев

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук


подпись, дата
25.05.2023

С.А. Коннова

Саратов 2023

Введение. Золото является одним из древних металлов, который открыл человек. Еще в древние времена коллоидное золото использовали в медицинских целях. Несмотря на многовековую историю, огромный всплеск интереса к золотым наночастицам возник в середине XX-начало XIX века с развитием нанотехнологии. В это время активно развиваются методы синтеза и контролируемого роста наночастиц. Сейчас золотые наночастицы активно используются во многих биомедицинских приложениях: геномике, иммуноанализе, клинической химии, фототерапии рака, адресной доставке лекарственных средств, ДНК и антигенов, фотоакустической визуализации и т.д. Такой широкий спектр применения обусловлен тем, что золотые наночастицы обладают уникальными физическими и химическими свойствами. Золото является инертным металлом, который биосовместим и имеет поверхность, которую можно модифицировать. Основным свойством золотых наночастиц является их поверхностный плазмонный резонанс, который можно настраивать на определенную длину волны, изменяя форму и размеры.

Быстрое развитие антибиотикорезистентности у многих бактерий приводит к росту числа заболеваний, которые трудно поддаются лечению. Поэтому использование комбинации золотых наночастиц и лазерного облучения представляет собой эффективный способ борьбы с антибиотикорезистентными микроорганизмами

Однако высокая мощность лазера может привести к фотомодификации (ФМ) золотых наночастиц, т.е. изменению формы и размера под действием лазерного излучения. В результате этого может измениться амплитуда и спектральное положение их плазмонного резонанса. Это отрицательно влияет на их дальнейшее практическое применение. Таким образом, существует необходимость в определении порогов повреждения наночастиц под действием лазерного излучения.

Целью данной работы было исследовать фотомодификацию нанозвезд и наноантенн под действием лазерного излучения, а также их цитотоксичность и фототермический антимикробный эффект.

Для достижения поставленных целей работы нужно было решить следующие задачи:

- 1) Проанализировать литературные данные по фотомодификации золотых наночастиц.
- 2) Синтезировать золотые нанозвезды и наноантенны с плазмонным резонансом, настроенным на длину волны из «окна прозрачности» биоткани.
- 3) Исследовать фотомодификацию золотых нанозвезд и наноантенн под действием импульсного лазерного облучения.
- 4) Исследовать цитотоксичность синтезированных наноантенн на клеточных линиях *in vitro* с использованием теста на восстановление резазурина.
- 5) Оценить чувствительности грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов к комбинированному действию низкоинтенсивного инфракрасного лазерного излучения (ИК НИЛИ) и золотых нанозвезд.

Исследование выполнялось с использованием современных методов. Синтез золотых нанозвезд и наноантенн осуществляли методами мокрой химии. После синтеза частицы покрывали тиолированным полиэтиленгликолем. Для исследования фотомодификации золотых наночастиц использовали перестраиваемый наносекундный лазер Ekspla NT 200 (Ekspla, Литва) и схему, в которой частицы двигались под давлением по капилляру. Во-первых, такая схема является имитацией движения наночастиц в кровотоке. Во-вторых, движение наночастиц по капилляру предполагает однократное облучение всего объема коллоида. Спектры экстинкции регистрировали с помощью двулучевого спектрофотометра Specord 250 (Analytik Jena, Германия) и скоростного спектрофотометра Specord S300. Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали с помощью микроскопа Libra-120(Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН. С помощью спектрофлуориметрического метода на основе реагента аламарового синего проводили тест на токсичность золотых наноантенн на двух линиях клеток: С6 глиоме и фибробластах кожи крысы. Для исследования фототермического антимикробного воздействия золотых нанозвезд *in vitro*

использовали низкоинтенсивный инфракрасный лазер и 2 культуры клеток: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Магистерская работа состоит из введения, 3 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 63 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: локализованный поверхностный плазмонный резонанс, окно прозрачности биологической ткани, характеристика основных видов золотых наночастиц: наносфер, наностержней, нанооболочек, нанозвезд и наноантенн; биомедицинские применения золотых наночастиц с использованием лазерного излучения: доставка лекарств, оптопорация, фотоакустическая визуализация, фототермическая и фотодинамическая терапии; исследования фотомодификации золотых наночастиц: наносфер, наностержней, нанооболочек и нанозвезд.

Основное содержание работы. Для исследования фотомодификации были получены золотые нанозвезды с диаметром ядра $144,2 \pm 12,3$ нм и длиной шипов $122,6 \pm 14,9$ нм, а также золотые наноантенны с диаметром ядра $28,3 \pm 2,5$ нм и длиной шипов $78,4 \pm 10,4$ нм. Основные пики плазмонного резонанса синтезированных наночастиц были настроены на длину волны лазера 900 нм. Для исследования фототермического антимикробного воздействия *in vitro* были синтезированы золотые нанозвезды со средним диаметром ядра $122,2 \pm 12,2$ нм и длиной шипов $114,6 \pm 19$ нм. Плазмонный резонанс была настроен на длину волны 840 нм, он имеет достаточно высокое значение экстинкции на длине волны инфракрасного низкоинтенсивного лазера 808 нм, который используется для облучения бактериальной суспензий. Для стабилизации наночастиц после синтеза их покрывали тиолированным полиэтиленгликолем (PEG-SH).

В данной работе исследовали фотомодификацию золотых нанозвезд и наноантенн. С помощью электронного микроскопа было обнаружено, что с ростом энергетической экспозиции у нанозвезд наблюдается уменьшение длины шипов и трансформация нанозвезд в наносферы. При энергетической

экспозиции 1040 мДж/см^2 происходит полная трансформация в наносферы, а также фрагментация частиц на мелкие фрагменты. Фотомодификация наноплазмонных наноструктур развивается по сходному сценарию. С увеличением энергетической экспозиции лазерного излучения количество исходных частиц постепенно уменьшается, тогда как доля золотых наносфер увеличивается.

Спектральный анализ позволяет удобно отслеживать ансамблевые изменения морфологии частиц. Для определенности мы оценили пороговое значение энергетической экспозиции как уменьшение основного пика плазмонного резонанса на 10%. Для золотых нанозвезд пороговым значением энергетической экспозиции начала фотомодификации является 130 мДж/см^2 . С ростом энергии помимо падения амплитуды основного пика также наблюдается рост плеча на 630 нм , что можно свидетельствовать об увеличении числа крупных частиц с небольшими выступами на поверхности (рисунок 1). При максимальной энергетической экспозиции облучения наблюдается выраженный максимум около 530 нм , характерный для золотых наносфер.

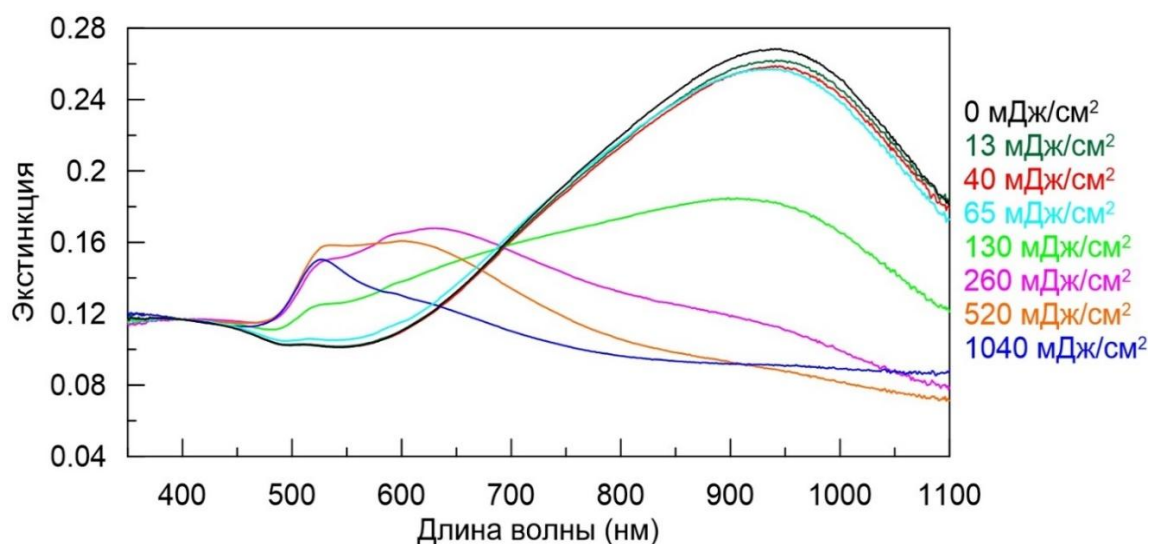


Рисунок 1 – Спектр экстинкции золотых нанозвезд до и после воздействия лазера с энергетической экспозицией от 13 до 1040 мДж/см^2

В случае наноплазмонных наноструктур старт фотомодификации начинается при энергетической экспозиции 13 мДж/см^2 . С ростом энергетической экспозиции

происходит падение амплитуды основного пика ПР и рост пика на 530 нм, что соответствует плазмонному резонансу золотых наносфер (рисунок 2).

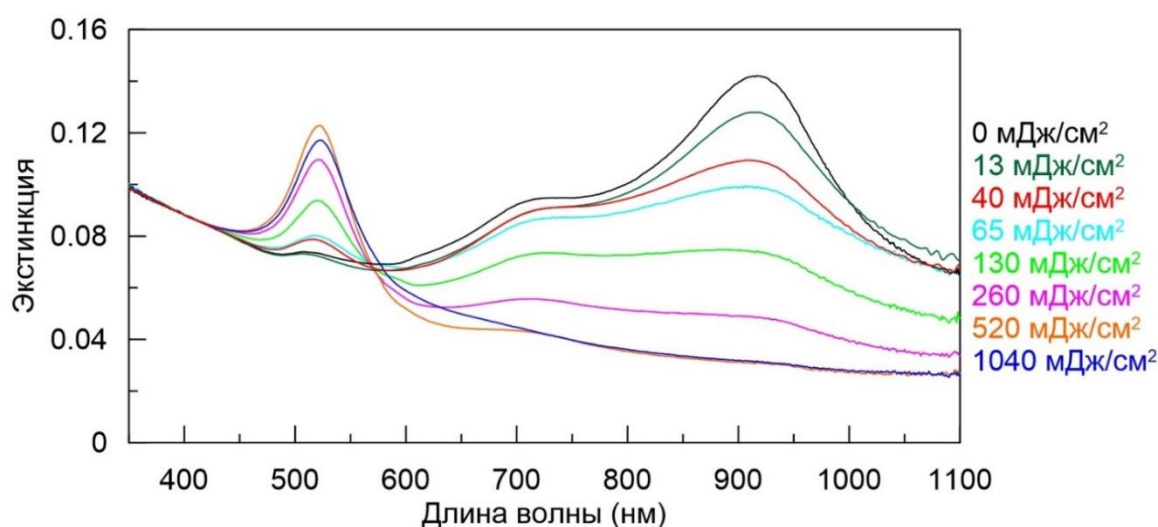


Рисунок 2 – Спектр экстинкции золотых наностержней до и после воздействия лазера с энергетической экспозицией от 13 до 1040 мДж/см²

Для дальнейшего биомедицинского применения золотых наностержней мы проверяли образцы на цитотоксичность. Количественную оценку жизнеспособности клеток измеряли с помощью спектрофлуориметрического метода с использованием красителя аламарового синего (резазурина), который проникает в клетки и может быть восстановлен митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до флуоресцирующего соединения резорурфина. Интегральная интенсивность флуоресценции резорурфина прямо пропорциональна количеству клеток и их метаболической активности. На рисунке 3 представлены количественные оценки метаболической активности клеточных линий: фибробластов кожи крысы (а) и глиомы крысы С6 (б) после инкубации с образцами золотых наностержней.

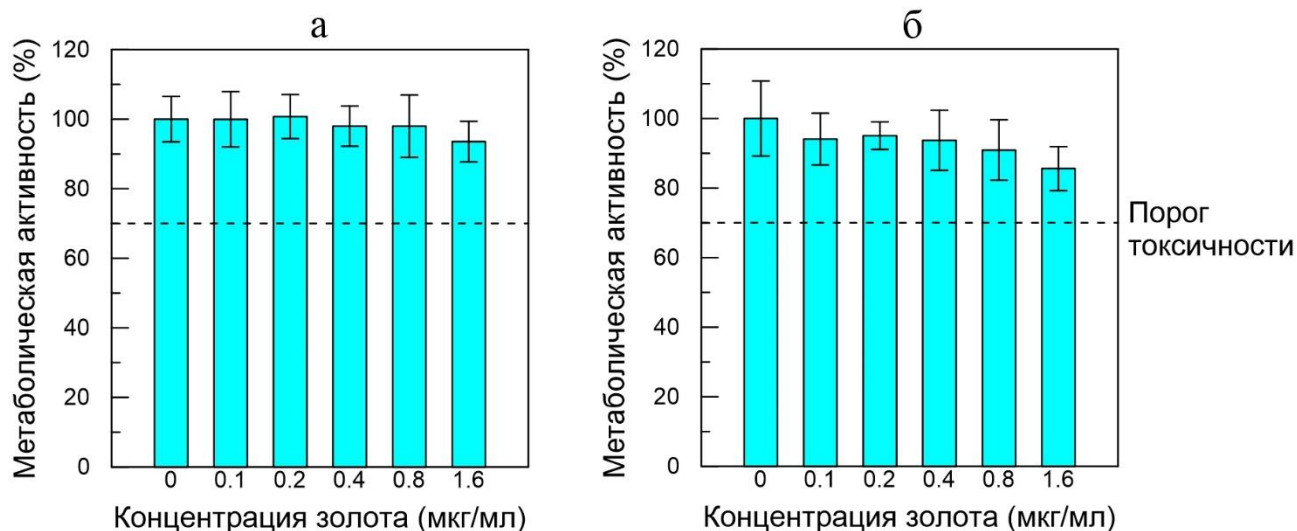


Рисунок 3 – Флуориметрическая количественная оценка метаболической активности клеточных линий фибробластов кожи крысы (а) и глиомы крысы С6 (б) после инкубации 24 ч с золотыми наночастицами

С увеличением концентрации золота от 0 до 1.6 мкг/мл происходит небольшое снижение метаболической активности клеток. При этом метаболическая активность клеток была выше порогового значения 70%. Таким образом, данные образцы золотых наночастиц не являются токсичными для обеих клеточных линий: фибробластов кожи крысы и глиомы крысы С6.

С использованием золотых нанозвезд было изучено влияние наночастиц в сочетании с низкоинтенсивным инфракрасным лазерным излучением (ИК НИЛИ) на длине волны 808 нм на выживаемость грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* 209 P и грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* 113-13. В работе использовали следующие варианты экспериментов: 1) бактериальные клетки в физиологическом растворе, облученные низкоинтенсивным инфракрасным лазерным излучением (ИК НИЛИ) (образец: лазер); 2) бактериальные клетки в растворе тиолированного полиэтиленгликоля, облученные ИК НИЛИ (образец: PEG-SH + лазер); 3) бактериальные клетки в суспензии с золотыми нанозвездами, покрытые PEG-SH и облученные ИК НИЛИ (образец: ЗНС + лазер). В качестве контроля

принимали оптическую плотность суспензии, не подвергавшейся облучению и не обработанной нанозвездами. Как можно заменить на рисунке 4, данный штамм золотистого стафилококка достаточно устойчив к действию лазерного излучения. После 30 минут облучения происходит сокращение численности лишь на 31% относительно контроля. PEG-SH не сильно влияет на фототермический эффект, наблюдается лишь незначительное изменение численности (3-5 %). В случае с использованием золотых нанозвезд в фототермической антимикробной терапии наблюдается выраженный угнетающий эффект бактерии *S. aureus* 209 P. Спустя 30 мин происходило сокращение относительного числа бактерий до 50%.

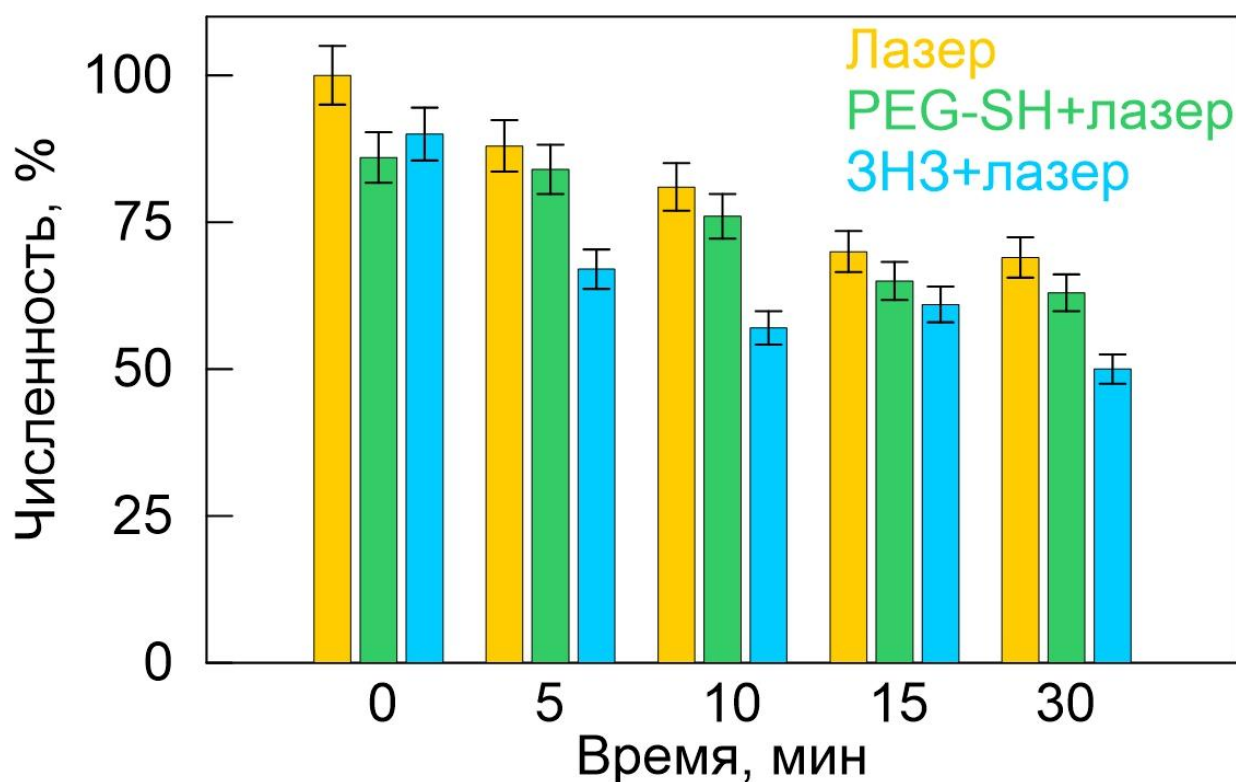


Рисунок 4 – Влияние инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²) и золотых нанозвезд на выживаемость *Staphylococcus aureus* 209 P

В случае с грамотрицательной бактерией *Escherichia coli* 113-13 (рисунок 5) было обнаружено, что она более восприимчива к инфракрасному лазерному излучению, и спустя 30 мин численность уменьшается в два раза. При этом в

суспензиях, которые содержат тиолированный полиэтиленгликоль, происходит усиление подавляющего эффекта излучения в среднем на 10%. При комбинированном воздействии лазера на золотые наночастицы после 5 минут численность *E. coli* 113-13 не превышала 49% от исходного количества, а уже после 30 мин снижалась до 12%.

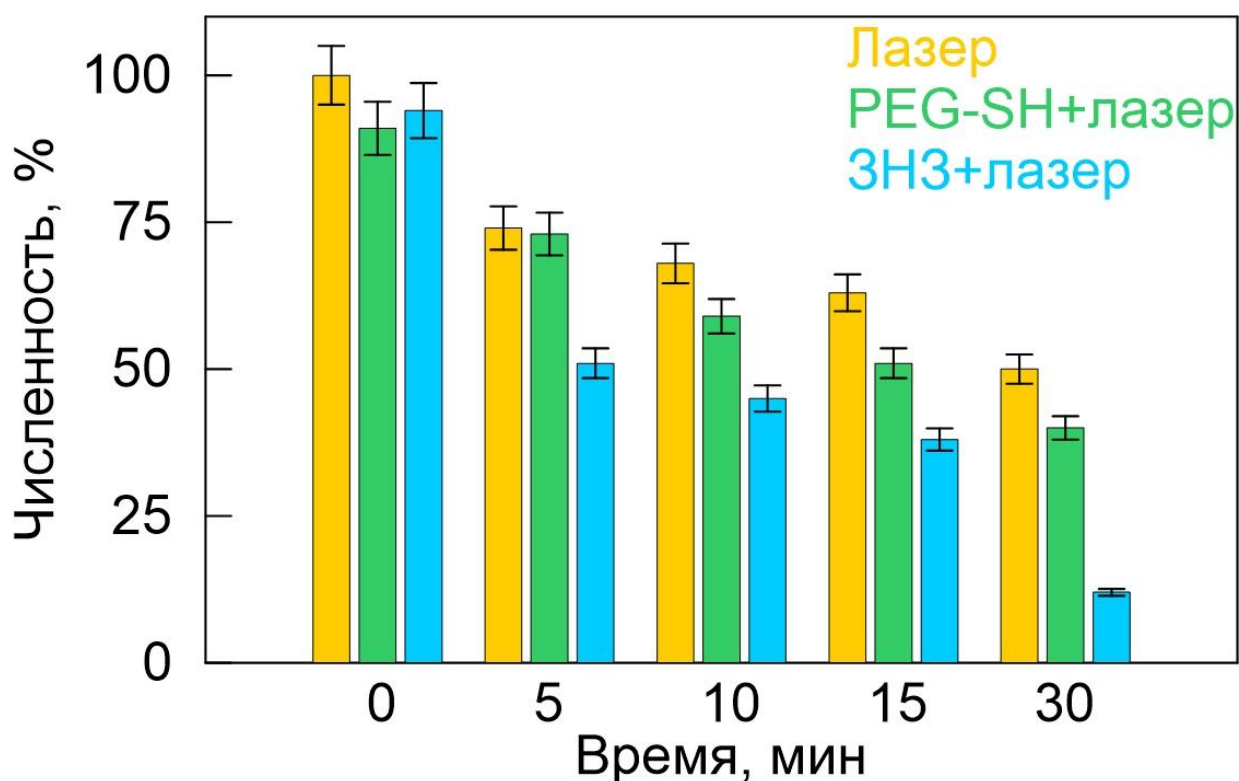


Рисунок 5 – Влияние инфракрасного лазерного излучения (808 нм, 60 мВт/см²) и золотых нанозвезд на выживаемость *Escherichia coli* 113-13

Помимо измерения численности клеток бактерий, было проведено измерение температуры суспензии (в равной степени для *S. aureus* и *E. Coli*) после воздействия лазера. В контрольной группе образцов без золотых наночастиц после 30 минут воздействия происходило повышение температуры на 18°C. В присутствии PEG-SH в растворе клеток бактерий наблюдалось незначительное повышение температуры на 1 °C относительно контроля. В экспериментах с использованием золотых нанозвезд температура бактериальных суспензий повышалась в среднем на 4°C по сравнению с контролем.

Заключение. В данной работе были определены пороги начала фотомодификации золотых нанозвезд и наноантенн. Данная задача является зачастую первостепенной при использовании лазерного облучения золотых наночастиц в биомедицине. Недавно разработанные золотые наноантенны продемонстрировали отсутствие цитотоксичности на двух клеточных линиях *in vitro*. В ходе экспериментов по фототермическому антимикробному воздействию *in vitro* было обнаружено, что комбинированное действие лазерного облучения и золотых нанозвезд наиболее эффективно против грамотрицательных бактерий. Данный факт может быть использован в качестве альтернативной борьбы с антибиотикорезистентными штаммами клинически значимых микроорганизмов. Полученные результаты являются основой для дальнейшего использования данных частиц в биомедицине.

Выводы:

1. Были проанализированы литературные данные по фотомодификации золотых наночастиц. Обнаружено, что фотомодификация золотых наносфер, наностержней, нанооболочек была исследована, а данные по фотомодификации золотых нанозвезд и наноантенн отсутствуют.

2. Были синтезированы 2 образца золотых нанозвезд: первый – с диаметром ядра $144,2 \pm 12,3$ нм, длиной шипов $122,6 \pm 14,9$ нм и второй – со средним диаметром ядра $122,2 \pm 12,2$ нм и длиной шипов $114,6 \pm 19$ нм, а также золотые наноантенны с диаметром ядра и длиной шипов $28,3 \pm 2,5$ нм и $78,4 \pm 10,4$ нм, соответственно. Плазмонный резонанс всех образцов был настроен на длину волны из «окна прозрачности» биоткани.

3. Проведено исследование фотомодификации нанозвезд и наноантенн под действием импульсного лазера и определены пороговые значения энергетической экспозиции начала фотомодификации для золотых нанозвезд - 130 мДж/см², а для золотых наноантенн - 13 мДж/см².

4. Обнаружено, что при увеличении энергетической экспозиции до 1040 мДж/см² происходит полная фотомодификация нанозвезд и наноантенн и их трансформация в сферические наночастицы.

5. С ростом энергетической экспозиции от 0 до 1040 мДж/см² у наноантенн происходит увеличение диаметра ядра с $28,3 \pm 2,5$ нм до $40,3 \pm 5,0$

нм, соответственно. Это связано с тем, что во время плавления часть золота с шипов перемещается на ядро. При этом у золотых нанозвезд при максимальной энергетической экспозиции наблюдается фрагментация частиц.

6. Анализ количественной оценки метаболической активности клеток под действием золотых наноплазмонных наночастиц показал, что данные наночастицы не проявляют цитотоксических эффектов в диапазоне концентраций от 0,1 до 1,6 мкг/мл.

7. Обнаружено, что золотые нанозвезды являются перспективным агентом для фототермического антимикробной терапии, в первую очередь, в отношении грамотрицательных микроорганизмов. Комбинированное действие лазерного облучения и золотых нанозвезд в течение 30 минут приводило к снижению численности *S. aureus* 209 P до 50%, а для *E. coli* 113-13 происходило снижение на 88 %.

8. Тиолированный полиэтиленгликоль не обладает токсическим эффектом в отношении микроорганизмов при отсутствии облучения. При этом имеются выраженные различия в чувствительности грамположительных и грамотрицательных бактерий на действие инфракрасного излучения в присутствии тиолированного полиэтиленгликоля. В суспензиях *S. aureus* 209 P происходит незначительное снижение на 3–5% численности относительно аналогичных условий в физиологическом растворе. При этом для *E. coli* 113-13 подавляющий эффект излучения усиливался в среднем на 10%.

Саша